

Los anticuerpos antiproteínas ribosomales P estimulan al receptor (3 adrenergico en la enfermedad de Chagas pero no en el lupus eritematoso sistémico

DAN KAPLAN, INES FERRARI, PABLO LOPEZ BERGAMI, EVELYN MAHLER, GABRIELA LEVITUS, PABLO A. CHIALE°, MARIANO J. LEVIN

Division Cardiología, Hospital Ramos Mejia, Laboratorio de Biología Molecular de la Enfermedad de Chagas, INGEBI-CONICET, Buenos Aires

Trabajo recibido para su publicación: 10/97 Aceptado: 10/97

Dirección para separatas: Hospital Ramos Mejia, Urquiza 609, (1221)Buenos Aires, Argentina

°Miembro Titular SAC

En la búsqueda de marcadores serológicos de daño miocárdico activo en la enfermedad de Chagas crónica describimos anticuerpos contra la región carboxi terminal de las proteínas ribosomales P de *Trypanosoma cruzi* en pacientes con evidencias histológicas de miocarditis. Los epitopes B y el efecto funcional de esos anticuerpos eran desconocidos. En este estudio realizamos el mapeo epitópico de los anticuerpos anti-P de 225 pacientes con enfermedad de Chagas crónica y de 12 pacientes con lupus eritematoso sistémico y evaluamos su efecto funcional. Los anticuerpos anti-P de pacientes chagásicos mostraron una marcada preferencia por las proteínas ribosomales P1 y P2 del parásito y el péptido de la región carboxi terminal correspondiente, R13 (EEEDDDMGFGLFD). En cambio los anticuerpos anti-P de pacientes con lupus eritematoso sistémico reaccionaron en igual grado con las proteínas ribosomales P humanas y del parásito y con los péptidos de la región carboxi terminal respectivos: H13 (EESDDDDMGFGLFD) y R13. La constante de afinidad para los anticuerpos anti-P inmunopurificados de pacientes con enfermedad de Chagas crónica estimada por biosensores fue cinco veces mayor para R13 que para H13. Estos péptidos presentan una región polianiónica homóloga a otro epítipo B (POP: AESEE) de la región carboxi terminal de la proteína ribosomal PO de *Trypanosoma cruzi*. POP genera anticuerpos que reaccionan en forma cruzada con la secuencia AESEE de la segunda asa extracelular (YH26R) del receptor (31 adrenergico. Por inhibiciones inmunoenzimáticas se demostró que los anticuerpos anti-R13 de los pacientes con enfermedad de Chagas crónica reconocen la porción ácida, homóloga a POP, de los péptidos H13 y H26R. Los anticuerpos purificados anti-R13 de pacientes con enfermedad de Chagas crónica desarrollaron un efecto cronotrópico positivo en cultivo de cardiomiocitos, similar al de los anticuerpos anti-(31. Dicho efecto puede ser inhibido por los péptidos R13, POP y H26R y por el bisoprolol. Por el contrario, los autoanticuerpos anti-P de pacientes con lupus eritematoso sistémico carecieron de actividad funcional. Los anticuerpos anti-P, a través de su efecto estimulante adrenergico, podrían participar en la patogenia de algunas manifestaciones de la cardiomiopatía chagásica crónica, en particular en las arritmias ventriculares, tan comunes en esta enfermedad. REV ARGENT CARDIOL 1998; 66 (2):127-137.

Palabras clave Cardiomiopatía chagásica crónica - Receptores (31 adrenergicos - Proteínas ribosomales P - Anticuerpos/Autoanticuerpos

La cardiomiopatía chagásica es la manifestación más frecuente y severa de la infección por *Trypanosoma cruzi*. En esencia es una cardiomiopatía dilatada con varias características peculiares, que incluyen una prevalencia elevada de bloqueos intraventriculares

(bloqueo de rama derecha, hemibloqueo anterior y su asociación), disfunción sinusal y arritmias ventriculares complejas. (1, 2) Las causas de mortalidad predominantes en la población chagásica son la insuficiencia cardíaca y las arritmias ventriculares ma-

lignas (taquicardia y fibrilacion ventricular). (2) El examen histologico del miocardio muestra infiltrados inflamatorios de celulas mononucleares, dano y destruccion de las celulas miocardicas y fibrosis. (1) El parasito rara vez es detectado en las lesiones miocardicas chagasicas; (1) sin embargo, las tecnicas de amplificacion del material genomico del parasito (PCR) (3,4) y las tecnicas inmunohistoquimicas permiten demostrar la presencia de acido desoxirribonucleico y proteinas parasitarias muy proximas a los focos inflamatorios, lo que implica que en esos focos existe una ruptura activa y eficiente del parasito. Estos hallazgos sugieren que la presencia del parasito en las celulas miocardicas es el estimulo primario para la perpetuacion de los mecanismos que generan las lesiones miocardicas chagasicas y el responsable de la respuesta inmune antiparasitaria incrementada. (6)

En nuestra busqueda de marcadores serologicos de dano miocardico activo en pacientes con infeccion chagastica cronica pudimos demostrar que el suero de aquellos que presentan cardiomiopatia manifiesta reconoce de manera predominante, entre otros determinantes antigenicos, las regiones C-terminales de las proteinas ribosomales P del *Trypanosoma cruzi*. (7-9) En las proteinas ribosomales P del parasito se describieron dos epitopes. El primero esta localizado en el peptido R-13, EEEDDDMGFGLFD, el principal epitope lineal de las proteinas ribosomales de bajo peso molecular P1 y P2. (8, 9) El segundo, definido por el peptido AESEE, denominado POP, esta ubicado en el extremo C-terminal de TcPO, la proteina ribosomal PO parasitaria de 34 kDa. (10, 11) Ambas secuencias peptidicas poseen segmentos de aminoacidos con cargas negativas que pueden contribuir a su antigenicidad y a su capacidad para inducir anticuerpos con actividad funcional dirigidos contra receptores de la membrana de las celulas miocardicas. (5, 12) Ello concuerda con el hecho de que la reactividad cruzada entre la proteina ribosomal TcPO y el receptor (31) adrenergico depende del pentapeptido POP. (11)

Los sueros de pacientes con cardiomiopatia cronica chagastica y miocarditis activa, en muestras del miocardio ventricular obtenidas por biopsia, presentan niveles de anticuerpos anti-R13 significativamente mas altos que los sueros de pacientes sin evidencias histologicas de miocarditis. (13, 14) Sin embargo, la relevancia patogenica de la respuesta anti-R13 y la naturaleza del estimulo antigenico que la desencadena son desconocidas. Bestetti (15) sugirio que la respuesta anti-R13 es el resultado de una reaccion autoinmune contra autoantigenos ribosomales P provenientes del tejido miocardico lesionado. Ello concuerda con las siguientes observaciones: 1) el extremo C-terminal de la proteina ribosomal P hu-

mana es homologo al peptido R13 del *Trypanosoma cruzi* y puede inducir respuestas autoinmunes, como ocurre con los autoanticuerpos anti-P en el lupus eritematoso sistmico; (16) 2) los anticuerpos anti-P en la cardiomiopatia chagastica cronica y el lupus eritematoso sistmico tienen la misma especificidad, definida por los 13 aminoacidos C-terminales de las proteinas ribosomales P del parasito y el hospedero humano. (8)

El objetivo de este estudio fue determinar silos anticuerpos anti-P inducidos en la cardiomiopatia chagastica cronica, y que reconocen la secuencia C-terminal R13, son autoanticuerpos dirigidos contra las proteinas P humanas, similares a los que se detectan en el lupus eritematoso sistmico, o anticuerpos dirigidos contra las proteinas ribosomales P del *Trypanosoma cruzi*. Por otra parte, como el extremo C-terminal de las proteinas ribosomales P posee un segmento de aminoacidos homologo al epitope extracelular acido del receptor 131 adrenergico (pentapeptido AESDE) y al peptido POP, (11) se estudio si los anticuerpos inducidos por esta porcion de las proteinas ribosomales pueden ejercer efectos funcionales sobre las celulas miocardicas. Para cumplir con los objetivos mencionados comparamos la especificidad y la reactividad cruzada de los anticuerpos anti-P de pacientes con cardiomiopatia chagastica cronica y lupus eritematoso sistmico con el receptor (31) adrenergico.

Nuestros resultados indican que los anticuerpos dirigidos contra el antigen R13 inducen efectos funcionales sobre el miocardio, a traves de los cuales podrian participar en la patogenia de las manifestaciones clinicas mas relevantes de la cardiomiopatia chagastica cronica.

MATERIAL Y METODO

Pacientes

Se estudiaron los sueros provenientes de 15 pacientes con cardiomiopatia chagastica cronica, de 6 pacientes con lupus eritematoso sistmico anti-P positivos, de 4 pacientes con leishmaniasis y de 14 controles (4 pacientes con cardiomiopatia dilatada idiopatica y 10 individuos sanos). Todos los pacientes con cardiomiopatia cronica chagastica provenian de la region noroeste de la Republica Argentina y fueron evaluados clinicamente mediante un examen clinico y cardiovascular, un electrocardiograma en reposo, una prueba ergometrica graduada, un ecocardiograma bidimensional y un registro electrocardiografico ambulatorio de 24 horas con sistema Holter.

Protefnas recombinantes

Los fragmentos de acido desoxirribonucleico que codifican para las proteinas ribosomales P del *Try-*

panosoma cruzi, TcP1 (17) y TcP2J3, (18) y las proteínas ribosomales P humanas HuP1 y HuP2, (19) fueron amplificadas por PCR utilizando los oligonucleótidos correspondientes y los clones 2 gTII originales como moldes. Los productos de la PCR fueron subclonados en el vector de expresión pMal-c2 (New England Biolab). La expresión y la purificación por afinidad de las proteínas recombinantes fueron realizadas como se describió en una publicación previa. (20)

Peptidos sintéticos

Los peptidos fueron preparados por el método de Merrifield de fase sólida, según la descripción de Muller y colaboradores, (21) con un multisintetizador semiautomático NPS 4000 (Neosystem, Strasbourg, Francia). Los peptidos crudos fueron purificados por cromatografía líquida preparativa. Los peptidos sintéticos R13 (EEEDDDMGFGLFD), R11(EDDDMGEGFLFD) e IE (EEEDDDMG) fueron derivados de la región C-terminal de las proteínas ribosomales P1 y P2 del *Trypanosoma cruzi* (9) y los peptidos H13 (EESDDDDMGFGLFD), H11(SDDDMGFGLFD) e IS (EESDDDDMG), de las proteínas P ribosomales de mamíferos. (16) Los peptidos C10 (DDDMGFGLFD) y C7 (MGFGLFD) correspondieron a una secuencia de consenso de la familia de la proteína ribosomal P. (9) El péptido POP (AESEE) fue derivado de la terminación C de la proteína PO (11) y el péptido H26R (HWWRAESDEARRCYNDPKCCDFVTNR) de la segunda asa extracelular del receptor (31 adrenergico humano. (22) En los inmunoensayos enzimáticos se utilizó como control el péptido TMVP (AEAALUKMALMKV), derivado de la proteína de superficie del virus mosaico del tabaco.

Conjugación de los peptidos

Los peptidos fueron acoplados a BSA con glutaraldehído en una relación molar 1:30. (23) Estos productos fueron evaluados mediante cromatografía líquida analítica de alta presión y el análisis de los aminoácidos fue utilizado para calcular la relación molar péptido/BSA.

Inmunoensayo enzimático con proteínas de fusión y peptidos sintéticos

El inmunoensayo enzimático fue realizado como se describió en una publicación previa. (8) Placas de poliestireno, de 96 pocillos, fueron cubiertas con 50 μ l de proteína recombinante (20 μ g/ml) o de peptidos conjugados (4 μ M) en 0,05 M de tampón bicarbonato-carbonato (pH 9,6). Las densidades ópticas (OD) fueron leídas a 415 nm. En los experimentos de inhibición los sueros fueron incubados inicialmente, por dos horas, a 37°C con cantidades crecientes de peptidos. Los resultados fueron expresados como porcentajes de inhibición.

Purificación de los anticuerpos

Para purificar por afinidad los anticuerpos anti-R13, anti-H13 y anti-H26R se utilizó una resina Act-Ultragel ACA 22 (Sepracor, Villanueva La Garenne, Francia) acoplada al péptido correspondiente. Dos ml de resina unida a 1 mg del péptido fueron incubados durante toda la noche a 4°C con 200 μ l de suero. La columna fue lavada con 20 ml de cloruro de sodio, 150 mM/fosfato de sodio, 12 mM, pH 7,4 (PBS) antes de eluirlo con un tampón de glicina 0,2 M (pH 2,8). El volumen de elución (500 μ l) fue neutralizado en forma directa con 100 μ l de tampón Tris 1 M (pH 8,0). La especificidad de los anticuerpos purificados fue evaluada por el método descrito por Levitus y colaboradores (19) y Tate y colaboradores. (24) Antes de ser usados para las pruebas los anticuerpos funcionales fueron dializados contra PBS.

Inmovilización de los anticuerpos purificados en la superficie del sensor

El sistema BIAcore y los reactivos para los análisis de interacción fueron obtenidos de BIAcore (Uppsala, Suecia). (25) La inmovilización de ligandos en la matriz de dextrano carboxilado fue realizada mediante los procedimientos estándar. La matriz carboxilada fue primero activada con 30 μ l de una mezcla de clorhidrato de N-etil-N1- [(3-di-metil amino) propil] carbodimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) en proporción 1:1. (25) La inmovilización de los anticuerpos (100 μ l a una concentración de 100 μ g/ml) fue realizada a un flujo de 5 μ l/minuto en tampón acetato 10 mM (pH 5,0). Los ésteres NHS remanentes fueron bloqueados por inyección de 35 μ l de clorhidrato de etalonamina 1M (pH 8,5). Las moléculas inmovilizadas en forma no covalente fueron extraídas por lavado de la superficie con 15 μ l de NaOH 100 mM. Finalmente, la matriz fue lavada con tampón 100 μ l de HBS (10 mM Hepes/0,15 M NaCl/3,4 mM EDTA/0,05% surfactante P20; pH 7,4).

Mediciones en el BIAcore

Peptidos conjugados (500 μ g/ml) diluidos en tampón HBS fueron sometidos a interacción con los anticuerpos adheridos a la matriz mediante el pasaje de los peptidos sobre el sensor, a un flujo de 5 μ l/minuto.

Pruebas funcionales

Los efectos cronotrópicos de los anticuerpos inmunopurificados fueron evaluados en cultivos de cardiomiocitos de ratas recién nacidas que laten en forma espontánea. Para disociar las células del corazón de ratas Wistar se utilizó una solución de tripsina y colagenasa. Los cardiomiocitos fueron cultivados por 4 días a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ como monocapas medio en DMEM/F-12 (Life Technologies Gaithersburg) conteniendo 5%

de suero fetal bovino. La frecuencia de latidos en condiciones basales, que se midió en 10 campos diferentes a 37°C en una platina termostatizada de un microscopio invertido, fue 120 ± 24 latidos por minuto. La frecuencia de latidos fue medida nuevamente una hora después de incubar el cultivo con anticuerpos inmunopurificados (dilución 1:50) y después del agregado de bisoprolol (1 μ M) o de los péptidos R13, POP o H26R (30 μ M).

Análisis estadístico

El promedio y las desviaciones estándar de las densidades ópticas obtenidas en el inmunoensayo enzimático fueron calculadas mediante el programa Statistica for Windows (Version 4.2; StatSoft). Las líneas de corte fueron definidas como el promedio ± 2 desvíos estándar de las densidades ópticas 415_{nm} de los sueros de 10 individuos sanos. La significación estadística de los resultados, comparando los sueros de los diferentes grupos, fue evaluada mediante el módulo ANOVA del mismo programa. La significación estadística de los cambios en la frecuencia de latidos de los cardiomiocitos fue evaluada con una prueba de t de Student para datos apareados. Todos los datos corresponden al promedio de por lo menos tres mediciones.

RESULTADOS

Especificidad de los anticuerpos anti-P inducidos en la cardiomiopatía crónica chagásica y el lupus eritematoso sistémico

Para comparar la especificidad de los anticuer-

pos anti-P presentes en la cardiomiopatía crónica chagásica y el lupus eritematoso sistémico, los sueros de estos dos grupos de pacientes fueron estudiados por inmunoensayo enzimático contra un panel de 4 proteínas ribosomales P recombinantes y 6 péptidos sintéticos. Los recombinantes fueron derivados de proteínas ribosomales P de *Trypanosoma cruzi* y humanas (TcPTcP1/TcP2f y HuP1/HuP2, respectivamente), mientras que los péptidos sintéticos correspondieron a la porción C-terminal de las proteínas P ribosomales del parásito (R13 y R11), las proteínas humanas P ribosomales (H13 y H11), y la región que es común a ambos (C10 y C7). La Figura 1A muestra la reactividad de diferentes sueros con las proteínas recombinantes. En los pacientes con cardiomiopatía crónica chagásica los niveles de anticuerpos contra los recombinantes de *Trypanosoma cruzi* fueron significativamente mayores que contra las proteínas humanas ($P < 0,005$), mientras que los sueros de los pacientes con lupus eritematoso sistémico se unieron de manera similar a los 4 recombinantes. En cambio, los sueros de pacientes con leishmaniasis o cardiomiopatía dilatada idiopática no reaccionaron con ninguna de las proteínas. La Figura 1B muestra la especificidad del perfil anti-P de los sueros chagásicos y lúpicos. Los primeros reaccionaron en forma predominante con los péptidos R13 y R11 y la unión a los péptidos H13 y H11 fue mayor que la unión a los péptidos C10 y C7. En contraste, los autoanticuerpos anti-P lúpicos mostraron una unión similar a los péptidos H13 y R13 y también se unieron fuertemente al péptido C7.

La especificidad de las reacciones anti-P en am-

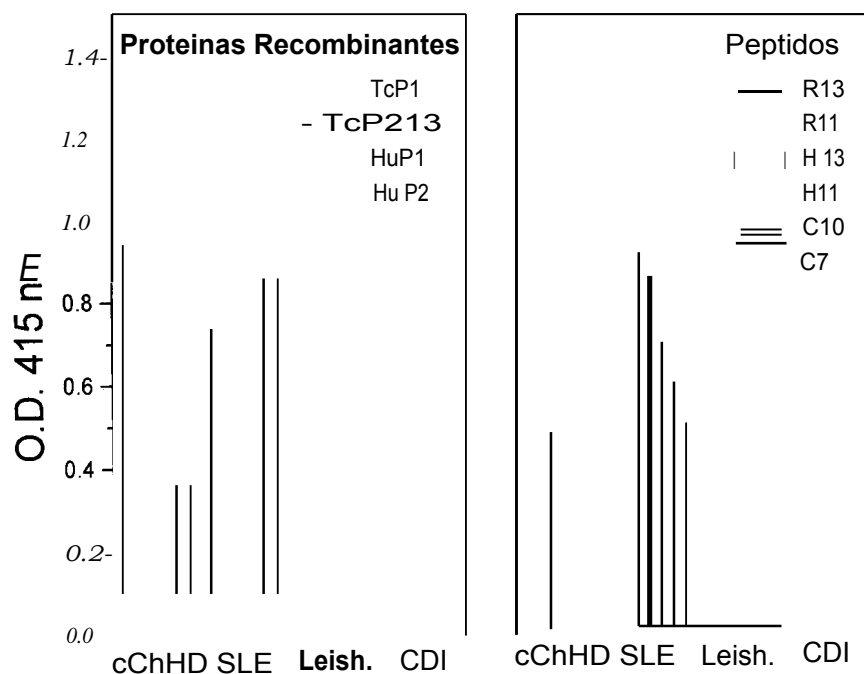


Fig. 1. Reactividad de sueros de pacientes con diferentes enfermedades contra proteínas ribosomales P recombinantes y los péptidos C-terminales correspondientes, medida por inmunoensayo enzimático. Los sueros de 15 pacientes con cardiomiopatía crónica chagásica (cChHD), de 6 pacientes con lupus eritematoso sistémico (SLE), de 4 pacientes con leishmaniasis (Leish) y de 4 pacientes con cardiomiopatía dilatada idiopática (CDI) fueron probados contra (A) proteínas recombinantes derivadas del *Trypanosoma cruzi* (TcP1 y TcP2p) y humanas (HuP1 y HuP2) y (B) los péptidos R13, R11, H13, H11, C10 y C7. Se empleó una dilución 1:400. * Indica la existencia de diferencias significativas ($p < 0,01$) entre los niveles de anticuerpos contra TcP1 y TcP21 comparados con los niveles de anticuerpos contra HuP2; y entre los niveles de anticuerpos anti R13 y R11 comparados con H13. Las flechas indican la línea de corte, definida como el promedio de las densidades ópticas ± 2 desvíos estándar de 10 controles sanos.

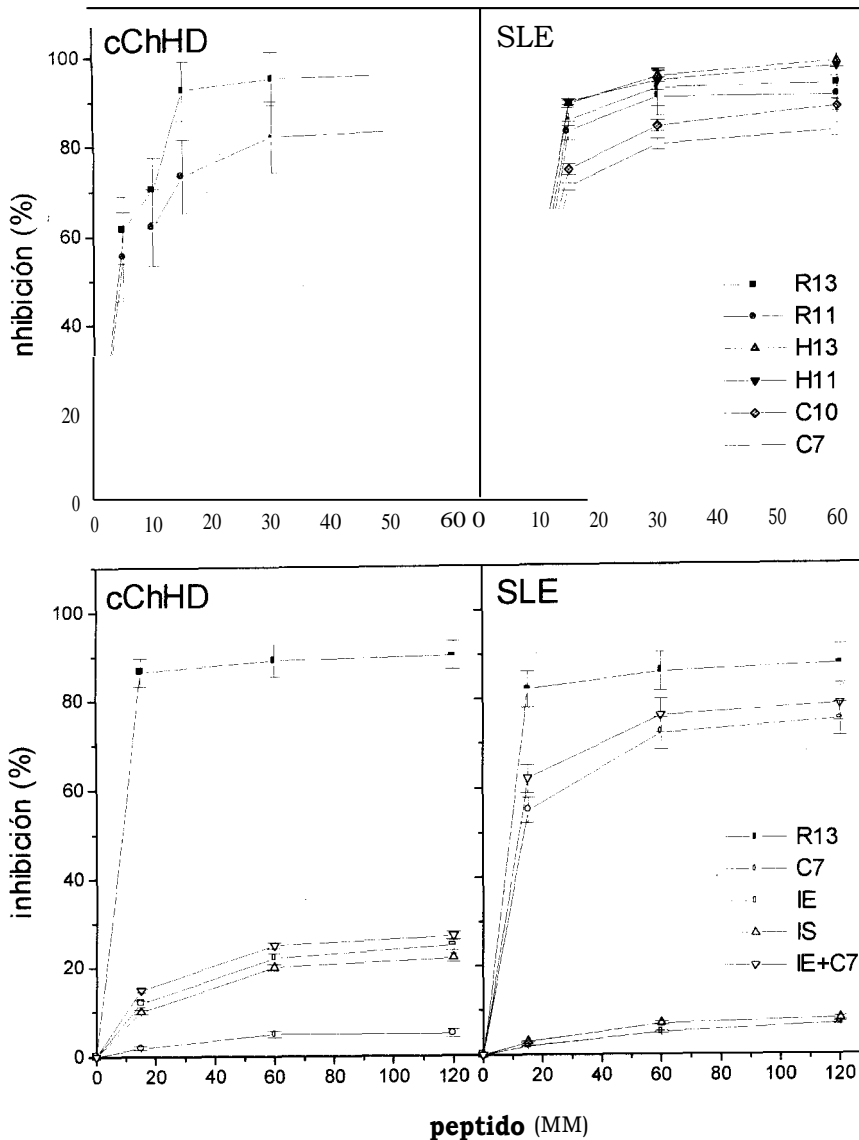


Fig. 2. Inhibición de la unión de los anticuerpos anti-P al péptido R13 mediante péptidos sintéticos. Los resultados se expresan como el promedio \pm el desvío estándar del porcentaje de inhibición obtenido con cantidades crecientes de péptidos, según se indica en la figura. cChHD corresponde a la inhibición de la actividad anti-P de dos sueros de pacientes con cardiomiopatía crónica chagásica; SLE a la inhibición de la actividad anti-P de sueros de pacientes con lupus eritematoso sistémico. La dilución de suero fue 1:400.

bas enfermedades fue verificada por experimentos de inhibición. Se analizó la capacidad de los péptidos C7, C10, H11, H13, R11 y R13 para inhibir la unión de los anticuerpos anti-P al péptido R13 de dos sueros chagásicos y de dos sueros lúpicos (Figura 2, A y B). Los resultados de las pruebas de inhibición confirmaron los de las pruebas de unión directa e indicaron que la infección crónica chagásica **no induce** una respuesta autoinmune anti-P típica, sino que origina una respuesta anti-P característica de la infección, expresada por los niveles elevados de anticuerpos contra el extremo C-terminal de la proteína del parásito, incluyendo R13 y R11 y por un reconocimiento débil de las contrapartes humanas.

Los hallazgos mencionados también sugieren que el segmento de residuos ácidos, EEEDDD, y en particular el tercer residuo Glu del péptido R13, puede contribuir a la especificidad del perfil de anticuer-

pos en la infección crónica chagásica. Para establecer si un epítopo definido se hallaba ubicado dentro del segmento de los residuos ácidos se preincubaron los sueros con péptidos internos derivados de R13 y H13 (péptidos IE e IS, respectivamente) y se estudió su reactividad anti-R13 por inmunoensayo enzimático (Figura 2, C y D). Ambos péptidos (IE e IS) inhibieron en forma parcial la actividad anti-P de los sueros chagásicos, inhibición que no aumentó por el agregado del péptido C7. Las reactividades anti-P de los sueros lúpicos fueron inhibidas en forma casi total por el péptido C7, pero no por los péptidos internos IE e IS (Figura 2 D). En marcado contraste, los anticuerpos anti-P inducidos por el *Trypanosoma cruzi* requirieron la secuencia R13 completa para lograr una unión máxima. Dentro de la secuencia R13 el tercer residuo glutámico (Glu-3) y el motivo terminal FGLFD tienen especial importancia para

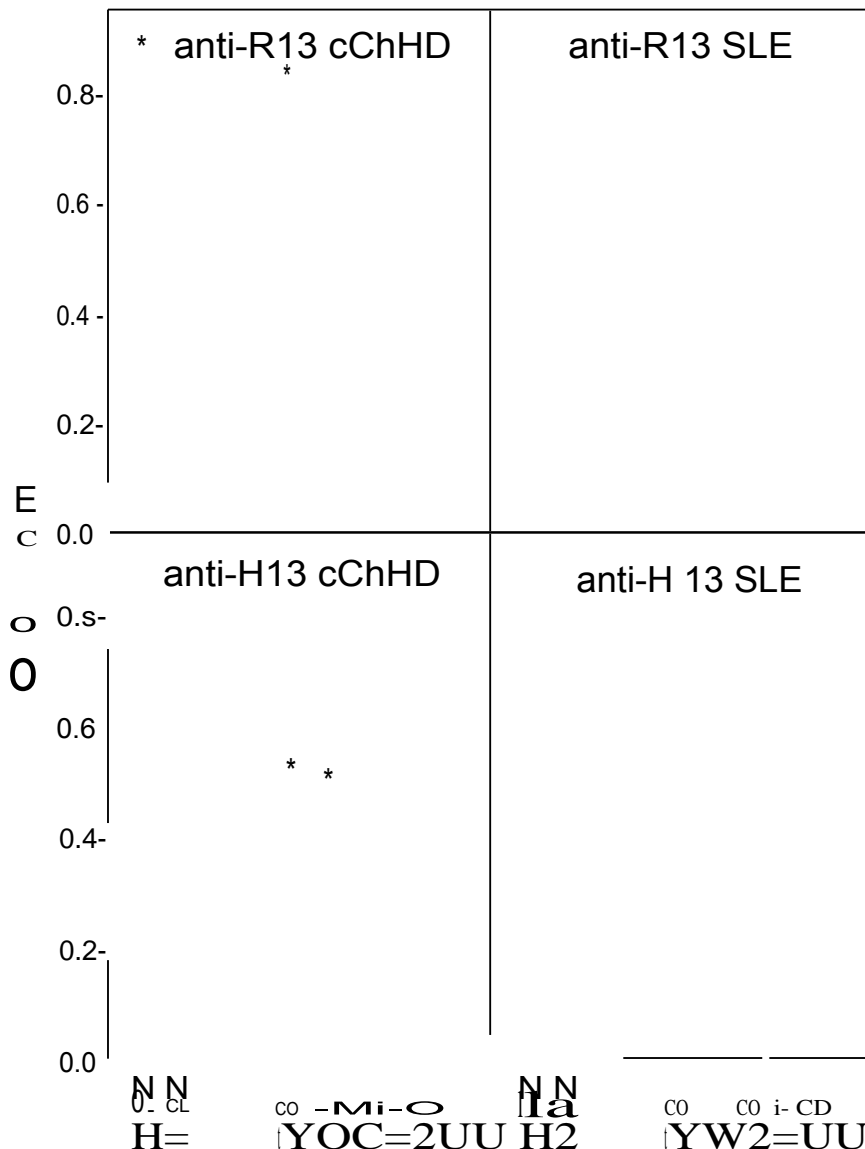


Fig. 3. Reactividad de los anticuerpos purificados por afinidad con proteínas recombinantes y péptidos sintéticos, medida por inmunoensayo enzimático. Anti-R13 cChHD y anti-H13 cChHD corresponden a los anticuerpos inmunopurificados anti-R13 y anti-H13 de un paciente con cardiopatía crónica chagásica; anti-R13 SLE y anti-H13 SLE a la inmunopurificación equivalente a partir del suero de un paciente con lupus eritematoso sistémico. Los anticuerpos fueron utilizados a una dilución 1:4. Los valores de densidades ópticas (promedio, \pm desvío estándar) corresponden a tres mediciones independientes. *: Indica la diferencia significativa observada para los anticuerpos obtenidos del paciente chagásico, que reaccionaron con mucha mayor intensidad ($p < 0,01$) contra TeP2(3, R13 y R11 que contra HuP2 y H13.

la antigenicidad, ya que la delección de los 5 residuos C-terminales o la sustitución de Glu-3 en el péptido R13 redujo su reconocimiento en igual medida. Ello es evidente por la inhibición equivalente de la reactividad anti-P lograda por H13, H11, IE e IS (Figura 2, A y C).

Propiedades moleculares y bioquímicas de los anticuerpos anti-P

El análisis de las reactividades anti-P en ambas enfermedades, cardiopatía crónica chagásica y lupus eritematoso sistémico, nos llevó a investigar el reconocimiento de los anticuerpos anti-P por los péptidos homólogos y heterólogos. Los anticuerpos de dos pacientes chagásicos que reaccionaron con R13 y H13 fueron purificados por afinidad y su unión a los diferentes péptidos fue medida y comparada con anticuerpos inmunopurificados en idénticas con-

diciones a partir del suero de dos pacientes lúpicos. La Figura 3 muestra la unión de los anticuerpos inmunopurificados de un suero chagásico (Figura 3, A y C) y de un suero lúpico (Figura 3, B y D). Los resultados indican que en ambas enfermedades los anticuerpos purificados reproducen el perfil de reactividad del suero total.

Los anticuerpos anti-P chagásicos purificados en columnas de afinidad R13 y H13 presentan la típica respuesta anti-P para la infección crónica chagásica, con alta afinidad por R13 y baja afinidad por H13 (Figura 3, A y C). En contraste, los autoanticuerpos anti-P lúpicos purificados en las mismas columnas reaccionaron de manera similar con los péptidos homólogo y heterólogo (Figura 3, B y D).

Las mediciones en el sistema BIAcore fueron utilizadas para confirmar la naturaleza de la unión de los anticuerpos anti-P chagásicos a los péptidos R13

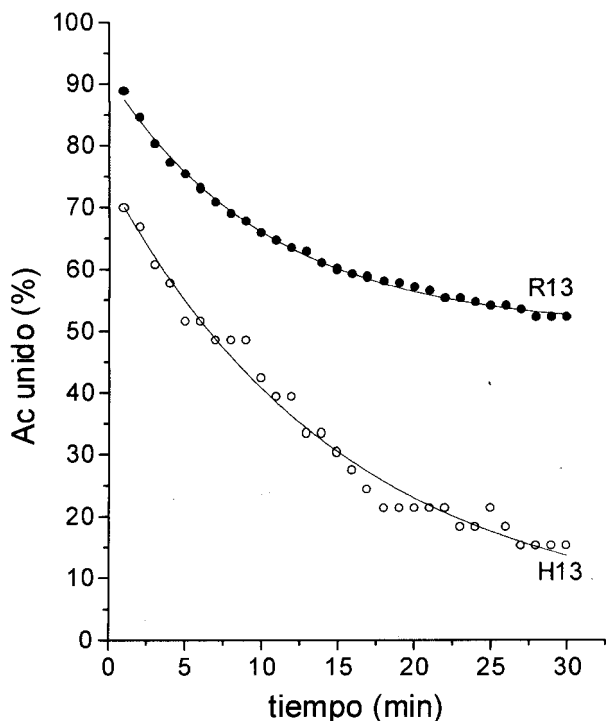


Fig. 4. Mediciones por BIAcore de la union de los peptidos R13 y H13 a anticuerpos anti-P chagasicos inmobilizados y purificados en columnas de afinidad R13. Las unidades de resonancia fueron convertidas en porcentajes de anticuerpos unidos. ●: Interaccion entre anticuerpos purificados y peptidos R13. ○: Interaccion entre anticuerpos purificados y H13.

y H13. Los anticuerpos anti-P fueron inmobilizados en el sensory se analizo la union de los peptidos. La Figura 4 muestra que los anticuerpos purificados en

la columna de afinidad R13 tuvieron constantes de disociacion promedio de $2,10^{-1} \text{ seg}^{-1}$ y $1,10^{-3} \text{ seg}^{-1}$ para los peptidos R13 y H13, respectivamente. Como es improbable que las constantes de asociacion de ambos peptidos difieran en forma significativa, la constante de afinidad en equilibrio de los anticuerpos para R13 es casi 5 veces mayor que para H13.

Tornados en conjunto, estos resultados sugieren que el blanco original del anticuerpo es el peptido ribosomal parasitario. El reconocimiento de H13 por los anticuerpos anti-P chagasicos pudo ser inhibido por los peptidos que contenian secuencias con cargas negativas, como IE, POP y H26R (que comprende la segunda asa extracelular del receptor 31 adrenergico), incluyendo el pentapeptido cross-reactivo AESDE. (11) Concuerta con ello el hecho de que los peptidos H26R, POP y H13 inhiben de manera similar la union de los anticuerpos anti-P chagasicos purificados al peptido R13 (Figura 5A). Sin embargo, los peptidos R13 y POP no inhiben la union de los anticuerpos anti-P lupicos al peptido R13 (Figura 5B).

Actividad funcional de los anticuerpos anti-P chagasicos

El reconocimiento de epitopes funcionales del receptor (31 adrenergico por los anticuerpos anti-P chagasicos fue estudiado en cultivos de cardiomiocitos de rata recién nacida. Este sistema ha sido utilizado para evaluar el efecto cronotropico de los anticuerpos antirreceptores (3 adrenergicos en la enfermedad de Chagas, la cardiomiopatía dilatada idiopática y la miocarditis aguda. (11, 12, 26, 27) La actividad fun-

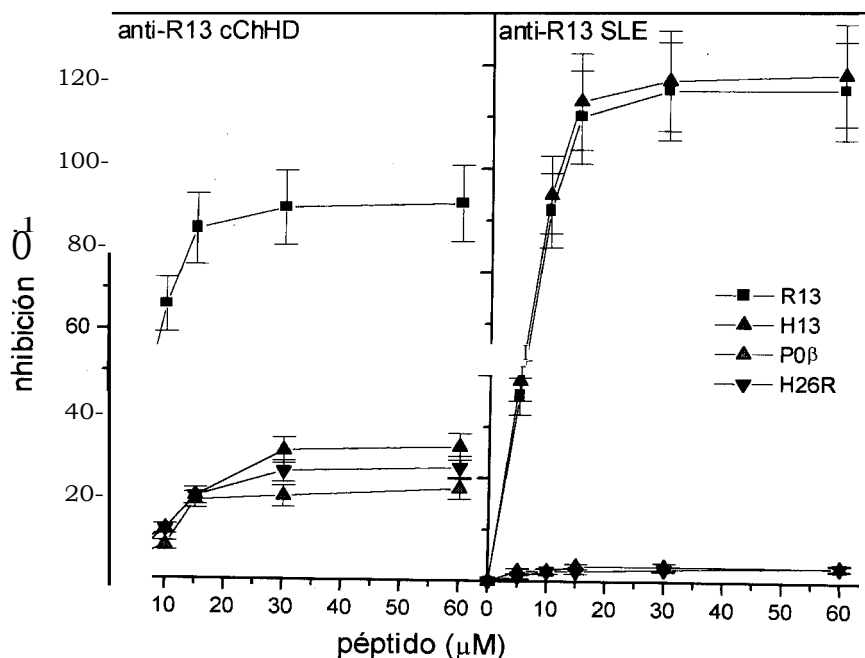


Fig. 5. Inhibición de la union al peptido R13 de los anticuerpos (Ac) anti-P chagasicos (anti-R13 cChHD) y lupicos (anti-R13 SLE), purificados en columnas de afinidad R13, por otros peptidos sinteticos. Los resultados fueron expresados como el promedio ± el desvio estandar de los porcentajes de inhibición con cantidades crecientes de los peptidos. Los anticuerpos fueron utilizados a una dilución 1:4.

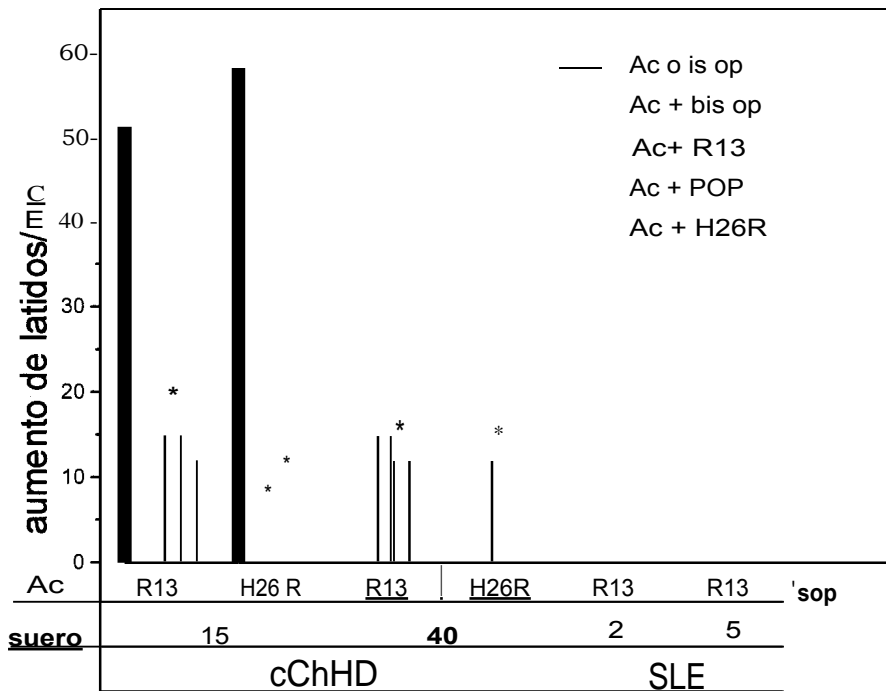


Fig. 6. Efecto cronotrópico de anticuerpos iunopurificados anti-R13 y anti-H26R de sueros chagasicos (cChCD) y lupicos (SLE). La especificidad del efecto observado fue evaluada por su inhibición con el bloqueante P1 específico bisoprolol (bisop) y los péptidos R13 POP y H26R. Los cardiomiocitos fueron estimulados, a continuación, con el agonista (β adrenérgico isoproterenol (isop)). Las barras representan el promedio \pm el desvío estandar del aumento de la frecuencia (latidos/min). * Los anticuerpos chagasicos produjeron una intensa estimulación cronotrópica que fue antagonizada total o parcialmente por los inhibidores ($p < 0,01$). Ac: anticuerpos inmunopurificados en columnas de afinidad R13 o H26R.

cional de los anticuerpos anti-P chagasicos purificados en columnas R13 fue comparada con la de los anticuerpos antirreceptor (31 adrenérgico del mismo paciente purificados en columnas H26R y con autoanticuerpos anti-P ltpicos purificados por afinidad.

Los anticuerpos anti-P chagasicos ejercieron un efecto cronotrópico positivo similar al de los anticuerpos antirreceptor (31 adrenérgico del mismo paciente). La Figura 6 ilustra el aumento de la frecuencia de latidos de los cardiomiocitos despues de la incubación con los anticuerpos anti-P de los pacientes chagasicos y con los anticuerpos antirreceptor (31 adrenérgico). Este efecto cronotrópico fue antagonizado por el bisoprolol, un bloqueante específico del receptor (31 adrenérgico). En cambio, los autoanticuerpos anti-P de los pacientes con lupus eritematoso sistémico carecieron de efecto cronotrópico.

El efecto cronotrópico positivo de los anticuerpos anti-P chagasicos y antirreceptor (31 adrenérgico fue antagonizado casi por completo por preincubación con los péptidos R13, POP y H26R que, por su parte, no modificaron la frecuencia de latidos de los cardiomiocitos.

Para demostrar que el complejo anticuerpo-peptido carecía de efectos tóxicos sobre los cardiomiocitos, estos fueron expuestos a la acción del agonista (3 adrenérgico isoproterenol, que produjo su efecto cronotrópico habitual (ISO en la Figura 6).

DISCUSION

Los pacientes con cardiomiopatía crónica chagásica manifiesta presentan una intensa respuesta humo-

ral contra el extremo C-terminal de las proteínas ribosomales P de bajo peso molecular del *Trypanosoma cruzi*. (7,8) Estas secuencias de aminoácidos son conservadas en la escala evolutiva y presentan un 90% de homología con las regiones C-terminales de las proteínas ribosomales P humanas, que son el blanco de los autoanticuerpos anti-P presentes en el suero de los pacientes con lupus eritematoso sistémico. (16) Como la reactividad de los autoanticuerpos anti-P y los anticuerpos dirigidos contra las proteínas P del parásito de los pacientes con cardiomiopatía crónica chagásica es similar, (7, 8, 28) varios autores concluyeron que los mecanismos que generan la respuesta autoinmune anti-P en el lupus eritematoso sistémico también operan en la inducción de la respuesta anti-P en la enfermedad de Chagas y podrían contribuir a la patogenia de la cardiomiopatía. (27,28)

Nuestros resultados demuestran que la infección crónica por *Trypanosoma cruzi* no induce la respuesta autoinmune anti-P que caracteriza a los pacientes con lupus eritematoso sistémico. En efecto, mientras los autoanticuerpos anti-P lúpicos reaccionan en la misma medida con las proteínas humanas y del *Trypanosoma cruzi* (Figura 1A), los anticuerpos anti-P de los pacientes con cardiomiopatía crónica chagásica tienen una preferencia muy marcada por las proteínas parasitarias y reaccionan en forma débil con las proteínas P humanas (Figura 1A). La unión de estos anticuerpos a los péptidos R13 y H13 y sus fragmentos más cortos, R11 y H11, conservo el mismo patrón (Figura 1B), lo que indica que el mayor determinante antigénico y el epítopo crosreactivo de las protei-

nas ribosomales P de bajo peso molecular en la enfermedad de Chagas esta ubicado en la secuencia de los 13 aminoácidos del extremo C-terminal. (8, 19)

El análisis de la unión de los anticuerpos anti-P chagasicos al péptido R13 muestra que el tercer residuo glutámico (Glu) es de importancia capital para su reconocimiento. El reemplazo de este aminoácido por serina genera el extremo C-terminal de la proteína ribosomal P humana (péptido H13), cambio que disminuye en forma ostensible la afinidad de los anticuerpos anti-P chagasicos por el péptido. Sin embargo, el reconocimiento del Glu-3 por los anticuerpos fue influenciado por los cinco residuos C-terminales de R13. El octapéptido EEEDDDMG, que corresponde a los 8 residuos N terminales del péptido R13, inhibió solo en forma parcial, y en igual medida que el péptido EESDDMG, la unión de los anticuerpos anti-P chagasicos al péptido R13 (Figura 2C). Como el agregado del péptido C7 al octapéptido no aumenta esta inhibición, esos residuos C-terminales ejercen su influencia en el contexto de la secuencia completa R13, hecho que sugiere que el epítopo dentro del péptido R13 es discontinuo. Esta interpretación es reforzada por la observación reciente que el ácido aspártico 13 es, junto con el Glu-3, indispensable para la unión de los anticuerpos anti-P chagasicos al péptido R13 (I. Ferrari, E. Mahler, comunicación personal).

Los experimentos con biosensor (datos semicuantitativos) mostraron que los anticuerpos anti-P de los pacientes con cardiomiopatía crónica chagásica, además de unirse a su blanco original (R13), reconocen, aunque con menor afinidad, al péptido H13 (Figura 4). Estos resultados concuerdan con el inmunoensayo enzimático directo (Figuras 1 y 3) y con los experimentos de inhibición (Figura 2, A y C). La propiedad de los anticuerpos anti-P, de pacientes chagasicos, de reaccionar con la porción ácida del péptido H13 es demostrada por las siguientes observaciones: 1) que la unión al péptido H13 es inhibida por el péptido IE y otros péptidos con segmentos cortos de residuos ácidos, como el H26R y el POP; 2) que estos últimos inhiben, en igual medida que el péptido H13, la unión de los anticuerpos al péptido R13 (Figura 5).

La naturaleza polianiónica de los anticuerpos anti-P chagasicos sugiere que los mismos podrían ser responsables, al menos en parte, del efecto funcional de la IgG de los pacientes con cardiomiopatía chagásica crónica sobre los receptores cardíacos. Se ha demostrado que los anticuerpos antirreceptores cardíacos responsables de este efecto reconocen secuencias polianiónicas. (12) Concuerda con ello el hecho de que los anticuerpos inmunopurificados anti-R13 y antirreceptor (31 adrenergico, provenientes de pacientes con cardiomiopatía crónica chagásica, ejer-

cen un marcado efecto cronotrópico positivo sobre las células miocárdicas. Esa acción es inhibida por los péptidos R13, H26R y POP, lo cual confirma la naturaleza crosreactiva de los anticuerpos anti-P y antirreceptor (31 adrenergico (Figura 6). El concepto de que la actividad funcional de los anticuerpos anti-P chagasicos está ligada al reconocimiento de las secuencias polianiónicas es confirmado por el hecho de que los autoanticuerpos anti-P lúplicos, extraídos en las columnas de afinidad R13, carecieron de efectos sobre las células miocárdicas (Figuras 5 y 6), lo cual puede ser explicado por la elevada afinidad de estos anticuerpos por el heptapéptido C-terminal.

Es destacable que los anticuerpos anti-P chagasicos desarrollaron su efecto funcional actuando solo sobre el receptor (31 adrenergico. Dado que los sueros chagasicos también poseen actividad antirreceptor (32 adrenergico y anti-M2 muscarínico, estos resultados sugieren que pueden existir otros antígenos parasitarios capaces de inducir otra variedad de anticuerpos antirreceptores de la membrana celular cardíaca. (12)

La reactividad anti-P es un rasgo distintivo de la cardiomiopatía crónica chagásica. El péptido R13 no es reconocido por los sueros de pacientes con paludismo o leishmaniasis. (19, 29) Además, los anticuerpos anti-P no son detectados en los individuos infectados por *Trypanosoma brucei*, (19) un parásito que contiene proteínas ribosomales P con el mismo extremo C terminal que las del *Trypanosoma cruzi*, (9) ni en los pacientes con infección chagásica aguda o con las formas digestivas de la enfermedad. (14)

Los resultados descriptos en este trabajo indican que en la cardiomiopatía crónica chagásica los ribosomas del parásito están expuestos al sistema inmune en forma directa. Dado que en la enfermedad de Chagas crónica las lesiones inflamatorias severas se observan solo en el corazón, (30) donde están asociadas con la presencia de antígenos y ácido desoxirribonucleico del parásito, (3, 4) es muy probable que el reconocimiento de las proteínas ribosomales P parasitarias ocurra en esos sitios. El hallazgo de niveles elevados de anticuerpos anti-R13 en pacientes chagasicos con miocarditis activa concuerda con esa presunción. (13, 14)

Nuestros resultados demuestran por primera vez la relevancia biológica de la reactividad anti-P generada durante la infección crónica por *Trypanosoma cruzi* y que esa reactividad está ligada con la presencia de un estímulo parasitario. Además, indican que la actividad funcional (y eventual patogenicidad) sobre el tejido miocárdico de los anticuerpos generados contra los antígenos intracelulares del parásito resultan de su capacidad para reaccionar en forma cruzada con proteínas de la membrana celular cardíaca.

En estudios recientes se demostró que los anticuerpos que reconocen receptores de la membrana celular acoplados a la proteína G, particularmente los receptores (31 adrenergicos, inducen una cardiomiopatía dilatada en animales de experimentación y que la eliminación de los mismos por inmunoadsorción produce una mejoría ostensible de la hemodinamia y los síntomas y previene las arritmias ventriculares graves en los pacientes con cardiomiopatía dilatada idiopática. Estas observaciones, junto con la vinculación estadística entre anticuerpos anti-R13 y dano miocárdico activo en pacientes con cardiomiopatía chagásica manifiesta, sugieren que estos anticuerpos pueden desempeñar un papel de primera magnitud en la patogenia de muchas de las manifestaciones clínicas de la enfermedad y permiten plantear nuevas estrategias terapéuticas dirigidas a impedir los efectos funcionales de los anticuerpos sobre el miocardio (bloqueo inmunológico, beta-bloqueantes).

Por otra parte, la demostración de que la generación de anticuerpos con actividad funcional sobre receptores de la membrana celular depende, en forma primaria, de un estímulo antigénico proveniente de una estructura citoplasmática del *Trypanosoma cruzi* obliga a replantear la utilización de quimioterápicos tripanomicidas, eficientes y tolerados a largo plazo para anular la producción de esos anticuerpos.

SUMMARY

ANTIBODIES TO RIBOSOMAL P PROTEIN OF TRYPANOSOMA CRUZI IN CHAGAS' DISEASE POSSESS FUNCTIONAL AUTORREACTIVITY WITH HEART TISSUE AND DIFFER FROM ANTI P AUTOANTIBODIES IN LUPUS

Anti-P antibodies present in sera from patients with chronic Chagas heart disease recognize peptide R13, EEEDDDMGFGLFD, which encompasses the C-terminal region of the *Trypanosoma cruzi* ribosomal P1 and P2 proteins. This peptide shares homology with the C-terminal region (peptide H13, EESDDDMGFGLFD) of the human ribosomal P proteins, which is in turn the target of anti-P autoantibodies in systemic lupus erythematosus and with the acidic **epitope, AESDE, of the second extracellular loop of the** (31-adrenergic receptor). Anti-P antibodies from chagasic patients showed a marked preference for recombinant parasite ribosomal P proteins and peptides, and parasite ribosomal P proteins and peptides to the same extent. **A** semi-quantitative estimation of the binding of chronic Chagas heart disease anti-P antibodies to R13 and H13 using biosensor technology indicated that the

average affinity constant was about 5 **times higher** for R13 than for **H13. Competitive enzyme immunoassays** demonstrated that chronic Chagas heart disease anti-P antibodies bind to the acidic portions of peptide H13, as well as to peptide H26R, encompassing the second extracellular loop of the (31 adrenergic receptor). Anti-P antibodies isolated from chronic Chagas heart disease patients exert a positive chronotropic effect in vitro on cardiomyocytes from neonatal rats, which resembles closely that of anti-(31 receptor antibodies isolated from the same patient. In contrast, systemic lupus erythematosus anti-P autoantibodies have no functional effect. Our results suggest that the adrenergic stimulating activity of anti-P antibodies may be implicated in the induction of functional myocardial impairments observed in chronic Chagas heart **disease.**

Key words Chronic Chagas' Heart Disease - III adrenergic receptors - Ribosomal P proteins - Antibodies / Autoantibodies

BIBLIOGRAFIA

- Rosebaum MB. Chagasic myocardiopathy. Prog Cardiovasc Dis 1964; 7: 199-225.
- Elizari MV, Chiale PA. Cardiac arrhythmias in Chagas' heart disease. J Cardiovasc Electrophysiol 1993; 4: 598-608.
- Jones EM, Colley DG, Tostes S, Lopes ER, Vnencak-Jones CL, Mc Curley TL. Amplification of *Trypanosoma cruzi* DNA sequences from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. Am J Trop Med Hyg 1993; 48: 348-357.
- Brandariz S, Schijman A, Vigliano C, Arteman P, Viotti R, Beldjord C y col. Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA from archival heart tissue of a chronic Chagas' heart disease reference case. Lancet 1995; 346: 1370-1371.
- Ferrari I, Levin MJ, Elizari MV. Cholinergic autoantibodies in sinus-node dysfunction. Lancet 1997; 350: 262-263.
- Levin MJ. In chronic Chagas heart disease, don't forget the parasite. Parasitol Today 1996; 12: 415-416.
- Levin MJ, Mesri E, Benarous R, Levitus G, Schijman A, Levy-Yeyati P y col. Identification of major *Trypanosoma cruzi* antigenic determinants in chronic chagas' heart disease. Am J Trop Med Hyg 1989; 41: 530-539.
- Mesri EA, Levitus G, Hontebeyrie-Joskowicz M, Van Regenmortel MHV, Levin MJ. Major *Trypanosoma cruzi* determinant in Chagas' heart disease shares homology with the systemic lupus erythematosus ribosomal P protein epitope. J Clin Microbiol 1990; 28: 1219-1224.
- Levin MJ, Vazquez M, Kaplan D, Schijman AG. The *Trypanosoma cruzi* ribosomal P protein family: classification and antigenicity. Parasitol Today 1993; 9: 381-384.
- Schijman AG, Levitus G, Levin MJ. Characterization of the C-terminal region of a T cruzi 38-kDa ribosomal PO protein that does not react with lupus anti-P autoantibodies. Immunol Lett 1992; 33: 15-20.
- Ferrari I, Levin MJ, Wallukat G y col. Molecular mimicry between the immunodominant ribosomal protein PO of *Trypanosoma cruzi* and a functional epitope on human (31-adrenergic receptor. J Exp Med 1995; 182: 59-65.
- Elies R, Ferrari I, Wallukat G y col. Structural and functional analysis of the B cell epitopes recognized by anti-receptor autoantibodies in patients with Chagas' disease. J Immunol 1996; 157: 4203-4211.
- Levin MJ. Molecular mimicry and Chagas heart disease: high anti-R13 autoantibody levels are markers of severe

- Chagas heart complaint. *Res Immunol* 1991; 142: 157-159.
14. Aznar C, Lopez Bergami P, Brandariz S y col. Prevalence of anti-R13 antibodies in human *T. cruzi* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1995; 12: 231-238.
 15. Bestetti RB. Role of parasites in the pathogenesis of Chagas' cardiomyopathy. *Lancet* 1996; 347: 913-914.
 16. Elkouk K, Bonfa E, Llovet R y col. Properties of the ribosomal P2 protein autoantigen are similar to those of foreign proteins antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 5186-5189.
 17. V3zquez MP, Shijman AG, Levin MJ. Nucleotide sequence of a cDNA encoding another *Trypanosoma cruzi* acidic ribosomal P2 type protein (TcP2b). *Nucleic Acids Research* 1992; 20: 2599.
 18. Schijman AG, Dusetti NJ, Vazquez MP y col. Nucleotide cDNA and complete deduced amino acid sequence of a *Trypanosoma cruzi* P ribosomal protein (P-JL5). *Nucl Acids Res* 1990; 18: 3399.
 19. Levitus G, Hontebeyrie-Joskowicz M, Van Regenmortel MHV, Levin MJ. Humoral autoimmune response to ribosomal P proteins in chronic Chagas heart disease. *Clin Exp Immunol* 1991; 85: 413-417.
 20. Lopez Bergami P, Cabeza Meckert P, Kaplan D y col. Immunization with recombinant *Trypanosoma cruzi* ribosomal P protein induces changes in the electrocardiogram of immunized mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1997; 18: 75-85.
 21. Miiller S, Couppez M, Briand JP y col. Antigenic structure of histone H2B. *Biochim Biophys Acta* 1985; 827: 235-246.
 22. Hoebeke J. Autoinmunidad contra los receptores cardiovasculares: implicaciones estructurales y funcionales. *Rev Argent Cardiol* 1995; 63: 221-230.
 23. Briand JP, Muller S, Van Regenmortel MHV Synthetic peptides as antigens: pitfalls of conjugation methods. *J Immunol Methods* 1985; 78: 59-69.
 24. Tate K, Magnusson Y, Viguiet M y col. Epitope analysis of T- and B-cell response against the human beta 1-adrenoceptor. *Biochimie* 1994; 76: 159-164.
 25. Chatellier J, Rauffer-Bruyere N, Van Regenmortel MHV, Altschuh D. Comparative interaction kinetics of two recombinant Fabs and of the corresponding antibodies directed to the coat protein of tobacco mosaic virus. *J Mol Recognition* 1996; 9: 39-51.
 26. Chiale PA, Rosenbaum MB, Elizari MV y col. High prevalence of antibodies against α_1 and α_2 adrenoceptors in patients with primary electrical cardiac abnormalities. *J Am Coll Cardiol* 1995; 26: 864-869.
 27. Chiale PA, Vallazza M, Feigelson S. Anticuerpos antirreceptores adrenérgicos beta con actividad agonista parcial en pacientes con cardiopatía eléctrica primaria. *Rev Argent Cardiol* 1998; 64: 119-127.
 28. Skeiky YAW, Benson D, Guderain JA y col. *Trypanosoma cruzi* acidic ribosomal P protein gene family. Novel P proteins encoding unusual cross-reactive epitopes. *J Immunol* 1993; 151: 5504-5515.
 29. Levin MJ, Franco da Silveira J, Frasch ACC y col. Recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens and Chagas' disease diagnosis: analysis of a workshop. *FEMS Microbiol Immunol* 1991; 89: 11-20.
 30. Andrade ZA. Pathogenesis of Chagas' disease. *Res Immunol* 1991; 142: 126-129.
 31. Viotti R, Vigliano C, Armenti H, Segura E. Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and serological evolution of patients with long-term follow-up. *Am Heart J* 1994; 127: 151-162.